

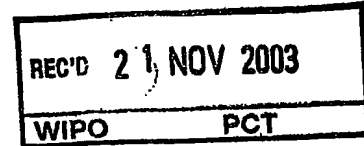
BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

27 OKT 2003

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



EP 03/11251



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 102 55 601.6

Anmeldetag: 28. November 2002

Anmelder/Inhaber: FLUORON GmbH, Neu-Ulm/DE

Bezeichnung: Herstellung eines Färbemittels zur Visualisierung
von Zellen im menschlichen oder tierischen Kör-
per

Priorität: 14.10.2002 DE 102 47 781.7

IPC: A 61 K, C 09 B

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüng-
lichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 17. Oktober 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Start

[Patentanmeldung]

5 **Herstellung eines Färbemittels zur Visualisierung
von Zellen im menschlichen oder tierischen Körper**

[Beschreibung]

Die Erfindung betrifft die Herstellung eines Färbemittels
10 zur Visualisierung von Zellen im menschlichen oder tierischen Körper.

[Stand der Technik]

Hierzu ist es aus der WO 99/58160 bekannt, als Farbstoff
15 Trypanblau zu verwenden. Diese aus der Klasse der Diazo-Farbstoffe bekannte Verbindung wird in einer wässrigen Lösung zum Einfärben der Vorderkapsel für eine Katarakt-Operation am Auge verwendet. Durch die Visualisierung der Vorderkapsel erkennt der Chirurg den Umriss der Kapsulorhe-
20 xis, wodurch die Phakoemulsifikation erleichtert wird.

Bei Trypanblau handelt es sich um eine zytotoxische Substanz, wie beispielsweise aus Solomon K.D. et al.: Protective effect of the anterior lens capsule during extra-
25 capsular cataract extraction, OPHTHALMOLOGY, vol. 96, no. 5, May 1989 (1989-05), 591-597 und Veckener M. et al.: Ocular toxicity study of trypan blue injected into the vitreous cavity of rabbit eyes, Graefe's Arch Clin Ex Ophthalmol (2002) 239: 698-704 bekannt ist. Bei der Verwendung von Trypanblau
30 ist daher die vollständige Ausspülung insbesondere des Augenbereiches, in welchem das Trypanblau als Färbemittel zum Einsatz gekommen ist, unmittelbar nach der Kataraktoperation

erforderlich, um einen längeren Verbleib im Körper bzw. im Auge zu vermeiden.

Ferner ist es bekannt (E. Kutchera, „Vitalfärbung der abgehobenen Netzhaut und ihre Defekte“, Albrecht v. Graefes Arch. klin. exp. Ophthal. 178, 72,87 (1969)) zur Sichtbarmachung von die gesamte Netzhaut betreffenden Defekten in Fällen von Netzhautabhebung den Farbstoff Patentblau intravitreal zu injizieren. Für die intravitreale Injektion wurde
10 eine 0,47%-ige Patentblau-Hyaluronsäure-Lösung verwendet. Die Visualisierung der Netzhautabhebung ist äußerst zeitaufwendig und ergibt sich erst einige Tage nach der Injektion.

[Aufgabe der Erfindung]

15 Aufgabe der Erfindung ist es, die Herstellung eines Färbemittels mit fehlender Zytotoxizität zu schaffen, welches zur Visualisierung von Membranen mit begrenzender oder trennender Funktion oder durch Erkrankung entstandener Membranen im menschlichen oder tierischen Körper geeignet ist.

20

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch die kennzeichnenden Merkmale des Patentanspruches 1 gelöst. Die Unteransprüche beinhalten vorteilhafte Weiterbildungen der Erfindung.

25 Bei der Erfindung wird durch die Verwendung eines keinen Vitalfarbstoff darstellenden und biokompatiblen Farbstoffs, vorzugsweise in einer physiologisch kompatiblen Lösung von insbesondere Natriumchlorid, die mit einem Puffer auf ein pH von 6,8 bis 7,8, insbesondere etwa 7,4 eingestellt sein
30 kann, ein Färbemittel zur Visualisierung von Zellen, insbesondere von trennenden oder begrenzenden Membranen im menschlichen und tierischen Körper geschaffen. Das bei der Erfindung zur Anwendung kommende Einfärbemittel kann zur Vitalitätsprüfung eingesetzt werden, wobei jedoch im Unter-

schied zu herkömmlichen Vitalfarbstoffen mit dem bei der Erfindung zur Anwendung kommenden biokompatiblen Farbstoff neben den toten Zellen zur Unterscheidung vom lebenden Material auch die lebenden Zellen eingefärbt werden können.

5

Vorzugsweise kommt als Farbstoff ein Triphenylmethan-Farbstoff zum Einsatz. Beispiele für derartige geeignete Farbstoffe sind Patentblau und Brillantblau R, wobei letzterer von der Proteinfärbung bei der Gelelektrophorese bekannt ist.

10

Bei Patentblau handelt es sich vorzugsweise um ein als Lebensmittelfarbstoff (L-Blau 3 = E 131) zugelassenes Patentblau V ($C_{54}H_{62}CaN_4O_{14}S_4$, MG: 1159,45).

15

Als Puffer kann ein Phosphat-, Hydrogencarbonat- oder Citrat-Puffer, dessen pH-Wert mittels Natriumhydroxid eingestellt werden kann, verwendet werden. Die Konzentration des biokompatiblen Farbstoffs, z.B. von Patentblau V beträgt in wässriger Lösung vorzugsweise 0,6 bis 2,5 g/l, insbesondere etwa 1,2 g/l. Man erreicht eine spontane Einfärbung der gewünschten Bereiche im menschlichen oder tierischen Körper.

20

Das Färbemittel kann zum Anfärben der Linsenkapsel, insbesondere der Linsenvorderkapsel bei einer Katarakt-Operation verwendet werden. Die Anfärbung erfolgt vor der Kapsulorhexis und Phakoemulsifikation.

25

Für die Anfärbung wird das Kammerwasser durch eine korneale oder sklerale Tunnelinzision abgesaugt und die Vorderkammer anschließend mit einem Gas, insbesondere Luft gefüllt. Mit einer Kanüle werden ca. 0,3 ml Färbemittellösung, z.B. von Patentblau V in die Vorderkammer verabreicht. Es entsteht die Anfärbung der Linsenkapsel, welche durch den Pupillen-

30

rand der Iris begrenzt ist. Nach einigen Sekunden wird zum Auswaschen des nicht benötigten Farbstoffes die Vorderkammer mit einer Natriumchlorid-Lösung ausgespült.

- 5 Anschließend wird für die Durchführung der Katarakt-Operation in herkömmlicher Weise eine viskoelastische Lösung in die Augenvorderkammer eingebracht. Aufgrund der blauen Verfärbung der Vorderkapsel tritt der Umriss der Kapsulorhexis klar hervor und lässt sich vom grauen Gewebe des Linsenkerns
10 klar unterscheiden.

- Ferner kann das Färbemittel zum Anfärben der Membrana limitans interna oder beispielsweise infolge von PVR (proliferative Vitreoretinopathie) entstandenen Membranen, insbesondere
15 re epiretinalen Membranen an der Netzhaut oder an der Rückfläche der Glaskörpergrenzmembran, insbesondere bei Netzhaut- und Glaskörperchirurgie zum Einsatz kommen.

- Beim Entfernen, beispielsweise einer epiretinalen Membran
20 von der Netzhaut wird mit Hilfe einer über die Pars plana eingebenden Kanüle der Farbstoff, beispielsweise Patentblau V in ca. 0,3 ml der angegebenen Pufferlösung selektiv zur zu entfernenden Membran gebracht. Der Glaskörper kann vorher ganz oder teilweise durch eine Gasfüllung, wie sie in her-
25 kömmlicher Weise bei der Glaskörper- oder Netzhaut-, insbesondere Makulachirurgie zum Einsatz kommt, ersetzt sein.
- Beim Anfärben der epiretinalen Membran kann gegebenenfalls eine Anfärbung des benachbarten Retinagewebes mit schwächerem Einfärbungsgrad erfolgen. Beim Entfernen der Membran von
30 dem darunter liegenden, nichteingefärbten Retinagewebe ergibt sich dann ein guter Kontrast. Nach dem Anfärben wird überschüssige Färbemittellösung ausgespült und der freie Raum durch den angesprochenen gasförmigen Glaskörperersatz angefüllt. Durch die Einfärbung ist es möglich, mit einem

nicht beleuchteten oder nur schwach beleuchteten Instrumenten beim Abtragen der Membran zu arbeiten. Hierdurch wird bei ausreichender Kontrastwahrnehmung die Lichttoxizität erheblich verringert. Insbesondere bei der Anwendung im Zusammenhang mit epiretinaler Membranen (Epiretinale Gliose, „macular pucker“, „surface wrinkling“) bildet der Einsatz der Färbemittellösung eine wertvolle Hilfe beim Aufsuchen und Entfernen der Membranen.

10 Wenn bei Makulaforamen mit zunehmender Lochgröße die Entfernung der Membrana limitans interna erforderlich ist, erweist sich die Einfärbung dieser Membran mit der Färbemittellösung als vorteilhaftes Hilfsmittel beim Aufsuchen und Entfernen dieser Membran während der Glaskörperchirurgie.

15

Ferner ist es möglich, ein viskoelastisches Material, beispielsweise Hyaluronsäure, welches als Hilfsmittel bei der ophthalmologischen Chirurgie zum Einsatz kommt, mit der Färbemittellösung einzufärben. Insbesondere lässt sich hierdurch bei der Katarakt-Operation eine Verbesserung des Kontrastes des viskoelastischen Hilfsmittels gegenüber dem intraokularen Gewebe, insbesondere der Augeniris und dem Fundusreflex erzielen.

25 Gegenüber dem herkömmlichen Trypanblau, welches teratogene oder mutagene Wirkung (Cahen RL: Evaluation of the teratogenicity of drugs, Clin Pharmacol. Ther, 1964, 5, 480-514 und Produktinformation BLURHEXTM, Dr. Agarwal's Pharma Ltd. Chennai (Indien)) hat, besitzt die erfindungsgemäße biokompatible Lösung, beispielsweise von Patentblau V oder Brillantblau R keine Zytotoxizität.

Zum Nachweis fehlender Zytotoxizität wurden Mauszellen L 929 und ARPE-19-Zellen mit dem erfindungsgemäßen Färbemittel Pa-

tentblau V mit unterschiedlichen Konzentrationen über 68 bis 72 Stunden im Brutschrank behandelt. Die Vitalität der Zellen und eine abgeleitete Zytotoxizität wird durch Bestimmung des Proteingehalts der behandelten Zellkulturen gegenüber
5 unbehandelten Kontrollkulturen quantitativ bestimmt. Mit einem Standard-Verfahren wird der Proteingehalt kolorimetrisch ermittelt.

Dabei zeigt sich, dass eine Zytotoxizität in signifikanter
10 Höhe entsprechend einer Wachstumshemmung von mehr als 30% nicht vorhanden ist.

Die Erfindung erweist sich insbesondere von Vorteil bei der Durchführung von Katarakt-Operationen mit dichten Katarakten
15 und/oder schwer pigmentierten Fundi, bei denen der Fundusreflex nur schwach ausgebildet ist oder fehlt. Mit Hilfe des Einfärbemittels erreicht man einen guten Kontrast zwischen der Vorderkapsel und dem unterliegenden Gewebe.

20 [Beispiele]

Im folgenden werden Ausführungsbeispiele des Färbemittels in verschiedenen Pufferlösungen angegeben.

Beispiel 1

25 Patentblau V mit einer Konzentration von 1,2 g/l in einer Phosphat-Puffer-Lösung.

200 ml Lösung enthalten:

0,240 g Patentblau V

30 0,380 g Dinatriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$)

0,060 g Natriumdihydrogenphosphat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$)

1,640 g Natriumchlorid (NaCl)

Natriumhydroxid zur pH-Einstellung.

Beispiel 2

Patentblau V mit einer Konzentration von 1,2 g/l in einer Hydrogencarbonat-Puffer-Lösung.

5

200 ml Lösung enthalten:

0,240 g Patentblau V

0,420 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)

1,640 g Natriumchlorid (NaCl)

10 Natriumhydroxid zur pH-Einstellung

Beispiel 3

Patentblau V mit einer Konzentration von 1,2 g/l in einer

15 Citrat-Puffer-Lösung.

200 ml Lösung enthalten:

0,240 g Patentblau V

0,216 g Trinatriumcitrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)

20 1,640 g Natriumchlorid (NaCl)

Natriumhydroxid zur pH-Einstellung

Identische Ausführungsbeispiele gemäß Beispiel 1, 2 und 3 können auch mit Brillantblau R mit einer Konzentration von

25 1,2 g/l hergestellt werden.

Vorzugsweise wird bei den Pufferlösungen der pH-Wert durch Natriumhydroxid eingestellt. Es ist jedoch auch möglich, die Lösung selbst auf den gewünschten pH-Wert (neutral, schwach sauer, schwach alkalisch) innerhalb des bevorzugten Bereiches von 6,8 bis 7,8 einzustellen. Die Einstellung der Konzentration von Patentblau auf vorzugsweise 0,6 bis 2,5 g/l, insbesondere etwa 1,2 g/l erfolgt durch eine entsprechende Menge an Patentblau V.

[Patentansprüche]

1. Verwendung eines Farbstoffs, der keinen Vitalfarbstoff darstellt und biokompatibel ist, zur Herstellung eines Färbemittels für die Visualisierung von Zellen im menschlichen oder tierischen Körper.
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Färbemittel zur Visualisierung von begrenzenden oder trennenden Membranen, insbesondere im Auge hergestellt wird.
3. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Färbemittel zur Visualisierung von aus einem Körperorgan, insbesondere dem Auge zu entfernenden Membranen hergestellt wird.
4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das Färbemittel zur Visualisierung der Linsenkapsel des Auges hergestellt wird.
5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Färbemittel zur Visualisierung der Linsenvorderkapsel bei einer Katarakt-Operation am Auge hergestellt wird.
6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das Färbemittel zur Visualisierung von durch Erkrankung in oder an einem Körperorgan, insbesondere der Netzhaut des Auges entstandenen Membranen hergestellt wird.
7. Verwendung nach Anspruch 6, wobei das Färbemittel zur Visualisierung epiretinaler Membranen hergestellt wird.

8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei das Färbemittel zum Einfärben einer insbesondere in der ophthalmologischen Chirurgie eingesetzten viskoelastischen Lösung hergestellt wird.
- 5 9. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, bei welcher der Farbstoff in einem neutralen oder schwach sauren oder schwach alkalischen Puffer gelöst wird.
10. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei der Farbstoff in einem Puffer mit einem pH-Wert von 6,8 bis 7,8 gelöst wird.
- 10 11. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei ein Phosphat-, Hydrogencarbonat- oder Citrat-Puffer verwendet wird.
12. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei die Konzentration des Farbstoffs in der Pufferlösung 0,3 bis 2,5 g/l, insbesondere etwa 1,2 g/l beträgt.
- 15 13. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei als Farbstoff ein Triphenylmethan-Farbstoff verwendet wird.
14. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei als Farbstoff Patentblau V verwendet wird.
- 20 15. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei als Farbstoff Brillantblau R verwendet wird.

[Zusammenfassung]

Verwendung eines biokompatiblen Farbstoffs, z.B. Patentblau
V oder Brillantblau R zur Herstellung eines Färbemittels für
5 die nicht zytotoxische Visualisierung von Zellen, insbeson-
dere begrenzenden oder trennenden Membranen im menschlichen
oder tierischen Körper, insbesondere im Auge.